

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
CONFÉDÉRATION SUISSE  
CONFEDERAZIONE SVIZZERA

09/622385  
EP99/1017

|       |             |
|-------|-------------|
| REC'D | 08 APR 1999 |
| WIPO  | PCT         |

### Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

### Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

### Attestazione

Gli uniti documenti sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

## PRIORITY DOCUMENT

Bern, 15. Jan. 1999

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum  
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle  
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentverfahren  
Administration des brevets  
Amministrazione dei brevetti

*U. Kohler*

N 18.02.98

Patentgesuch Nr. 1998 0388/98

HINTERLEGUNGSBESCHEINIGUNG (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:

Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten.

Patentbewerber:

Lonza AG, Gampel/Wallis. Geschäftsleitung

4002 Basel

Anmeldedatum: 18.02.1998

Voraussichtliche Klassen: C07C, C12P

L.P. 1778, Schweiz  
Patentgesuch Nr.

- Erstanmeldung  
vom

LONZA AG

(Gampel / Wallis)

(Geschäftsleitung: Basel)

Verfahren zur Herstellung von Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten

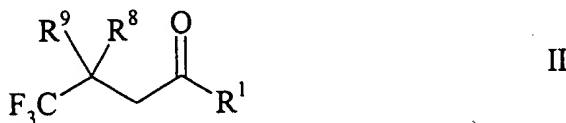
Aufgabe der vorliegenden Erfindung war ein biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäurederivaten zur Verfügung zu stellen, mit welchem das gewünschte Produkt in guter optischer Reinheit und mit guter Ausbeute isoliert werden kann.

5

Diese Aufgabe wird mit dem Verfahren nach Anspruch 1 gelöst.

Erfindungsgemäss wird das Verfahren derart durchgeführt, dass man ein Trifluoracetessigsäurederivat der allgemeinen Formel

10



worin

$\text{R}^1 = -\text{OR}^4$ , worin  $\text{R}^4$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl, gesättigt oder ungesättigt,  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl,

15

Aryl, Alkoxyalkyl oder Alkoxyalkoxyalkyl bedeutet,

$-\text{NR}^5\text{R}^6$ , worin  $\text{R}^5$  und  $\text{R}^6$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl, Aryl oder  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl bedeutet, oder

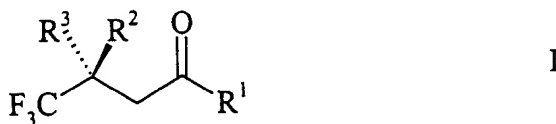
$-\text{SR}^7$ , worin  $\text{R}^7$  Wasserstoff,  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl, Aryl oder  $\text{C}_{3-8}$ -Cycloalkyl bedeutet, und

$\text{R}^8$  und  $\text{R}^9$  zusammen  $=\text{O}$  ist, mittels Mikroorganismen, die befähigt sind eine

Carbonylfunktion zu reduzieren oder mittels einem zellfreien Enzymextrakt dieser

20

Mikroorganismen, in die Verbindung der allgemeinen Formel



worin  $\text{R}^1$  die genannte Bedeutung hat,  $\text{R}^2$  Wasserstoff und  $\text{R}^3 -\text{OH}$  ist, überführt.

25

$\text{C}_{1-10}$ -Alkyl kann gesättigt oder ungesättigt sein. Als gesättigtes  $\text{C}_{1-10}$ -Alkyl kann im folgenden eine verzweigte oder unverzweigte primär, sekundär oder tertiär aliphatische Gruppe wie

einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind diese Mikroorganismen zusätzlich noch mit einem Gen, codierend für eine Glucosedehydrogenase, transformiert. Die Gene, codierend für eine Aldehydreduktase und/oder Glucosedehydrogenase, werden zweckmässig integriert in Plasmiden transformiert. Demzufolge kann die Biotransformation mittels Mikroorganismen durchgeführt werden, die:

- mit mindestens einem Plasmid, enthaltend ein Aldehydreduktase- und ein Glucosedehydrogenase-Gen, oder
- mit mindestens zwei Plasmiden, enthaltend jeweils ein Glucosedehydrogenase- oder ein Aldehydreduktase-Gen
- mit mindestens einem Plasmid, enthaltend ein Aldehydreduktase-Gen transformiert sind.

Vorzugsweise wird die Biotransformation mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* JM109 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens zwei Plasmiden enthaltend jeweils ein Aldehydreduktase- oder ein Glucosedehydrogenase-Gen, oder mittels Mikroorganismen der Spezies *E. coli* HB101 oder *E. coli* DH5, transformiert mit mindestens einem Plasmid, welches beide Gene, das Aldehydreduktase- und das Glucosedehydrogenase-Gen enthält, durchgeführt. Insbesondere wird die Biotransformation mit *E. coli* JM109, enthaltend ein Aldehydreduktase- und ein Glucosedehydrogenase-Gen, durchgeführt. Selbstverständlich kann die Biotransformation auch mit mindestens zwei Mikroorganismen, die jeweils nur eines der genannten Gene enthalten, durchgeführt werden.

Wird als Mikroorganismus *E. coli* JM109 oder *E. coli* HB101 verwendet, wird, wie fachmännisch bekannt, die Expression der Gene durch IPTG (Isopropylthiogalactosid) induziert. Bei der Verwendung von *E. coli* DH5 ist die Induktion mit IPTG, wie fachmännisch bekannt, nicht notwendig.

Die Mikroorganismen *E. coli* JM109, enthaltend mindestens zwei Plasmide mit Genen jeweils codierend für eine Aldehydreduktase und für eine Glucosedehydrogenase, pKAR und pKKGDH, wurden am 16.12.1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, unter der Bezeichnung DSMZ 11902 gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

Der pH-Wert der Medien kann in einem Bereich von 5 bis 10, vorzugsweise von 6 bis 8, liegen.

Zweckmässig wird die Biotransformation bei einer Temperatur von 5 bis 60 °C, vorzugsweise von 10 bis 40 °C, durchgeführt.

5

Nach einer Umsetzungszeit von wenigen Minuten bis 50 h, kann dann das gewünschte Produkt in hoher Ausbeute und Enantiomerenreinheit (ee) isoliert werden.

10

### Beispiel 1

#### Anzucht der Mikroorganismen

15 Zellen von E. coli JM109 pKARpKKGDH (DSMZ 11902) wurden in einem 20 l Fermenter in 12 l Mineralsalzmedium (Tabelle 1) bei 22 °C angezüchtet. Nach 6 h wurde IPTG hinzugegeben, um die Zellen zu induzieren. Dann wurde Glycerin hinzugegeben und die Zellen bis zu einer optischen Dichte  $OD_{650nm} = 41,8$  innerhalb 52 h angezüchtet. Dann wurden die Zellen bei -80 °C aufbewahrt.

### 20 Tabelle 1

|  |          |
|--|----------|
| Hefeextrakt  | 0,5 g/l  |
| Glycerin   | 30 g/l   |
| MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O               | 0,8 g/l  |
| CaCl <sub>2</sub>                                    | 0,16 g/l |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 2,0 g/l  |
| SLF-Lösung   | 1,0 ml/l |
| Fe-EDTA-Lösung                                       | 1,5 ml/l |
| PPG-2000   | 0,1 g/l  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 1,0 g/l  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 1,0 g/l  |

mit einem ee-Wert von >99%, entsprechend einer molaren Ausbeute von 67,8 %.

- 5 b) Zu 800 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,0) enthaltend die Mikroorganismen gemäss Beispiel 1 bei einer  $D_{650nm} = 30,7$  wurde 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoracetoacetathylester wurde hinzugegeben und die resultierende Mischung in einen Fermenter entsprechend zu Beispiel 2 eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf pH 6,0 gehalten. Nach 25 h wurde nochmals 10 g 4,4,4-Trifluoracetoacetathylester hinzugefügt. Nach 45 h enthielt die organische Phase 49 g 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureethylester mit
- 10 einem ee-Wert von > 99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 60,6 %.

### Beispiel 3

#### 15 Herstellung von 4,4,4-Trifluor-3(R)-hydroxybuttersäureisopropylester

- Zu 800 ml Mineralsalzmedium entsprechend zu Beispiel 1 enthaltend E. coli JM109 pKARpKKGDH bei einer  $OD_{650nm} = 9,7$  wurden 140 g Glucose und 0,56 g  $NADP^+$  hinzugefügt. 400 ml Butylacetat enthaltend 70 g 4,4,4-Trifluoressigsäureisopropylester wurde hinzugegeben und die resultierende Mischung in einem Fermenter entsprechend zu Beispiel 2
- 20 eingespeist. Der pH wurde durch Zugabe von 1 M  $Na_2CO_3$  auf pH 6,0 gehalten. Nach 21 h enthielt die organische Phase 42,2 g (R)-4,4,4-Trifluor-3-hydroxybuttersäureisopropylester mit einem ee-Wert von >99 %, entsprechend einer molaren Ausbeute von 59,7%.

- 15